

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 11183372 A

(43) Date of publication of application: 09 . 07 . 99

(51) Int. Cl.

G01N 21/27
G01N 21/41

(21) Application number: 09384360

(22) Date of filing: 19 . 12 . 97

(71) Applicant: TOTO LTD

(72) Inventor:
UCHIYAMA KENICHI
MORIYAMA YASUSHI
KANZAKI KEISUKE
SONEZAKI SHUJI
OGAWA ERIKA

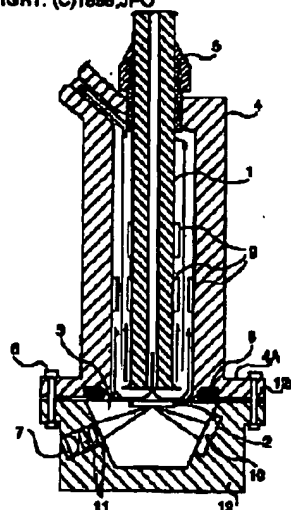
(54) SPR SENSOR DEVICE, ANALYSIS SYSTEM AND
DETECTING METHOD USING IT

COPYRIGHT: (C)1999,JPO

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a surface plasmon sensor device having a small size and high detection accuracy and capable of detecting a plurality of materials.

SOLUTION: A fluid feed pipe 1 is erected on the detection surface 2 of a prism 3. The feed pipe 1 is made linear and sufficiently long so that a fluid flows in it as a laminar flow. The outlet of the feed pipe 1 directly faces the detection surface 2 at a slight gap, and it is flared to guide the fluid laminar flow to the detection surface 2 and release it to the outside without disturbing it. A fluid discharge pipe 4 is a large-diameter circular pipe. It is arranged to locate the feed pipe 1 at the center axis position, and it is firmly crimped to the surface of the prism 3 by bolts and nuts 6. A link section between the discharge pipe 4 and the surface of the prism 3 is smoothly curved not to disturb the fluid flow. Ring-like electrodes 9 are fitted to the feed pipe 1 and the discharge pipe 4 as electrochemical sensors.



Best Available Copy

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-183372

(43)公開日 平成11年(1999) 7月9日

(51)Int.Cl.⁹

識別記号

F I

G 0 1 N 21/27
21/41

G 0 1 N 21/27
21/41

C
Z

審査請求 未請求 請求項の数10 F D (全 10 頁)

(21)出願番号 特願平9-364360

(22)出願日 平成9年(1997)12月19日

(71)出願人 000010087

東陶機器株式会社

福岡県北九州市小倉北区中島2丁目1番1号

(72)発明者 内山 兼一

福岡県北九州市小倉北区中島2丁目1番1号 東陶機器株式会社内

(72)発明者 森山 康司

福岡県北九州市小倉北区中島2丁目1番1号 東陶機器株式会社内

(74)代理人 弁理士 上村 輝之 (外1名)

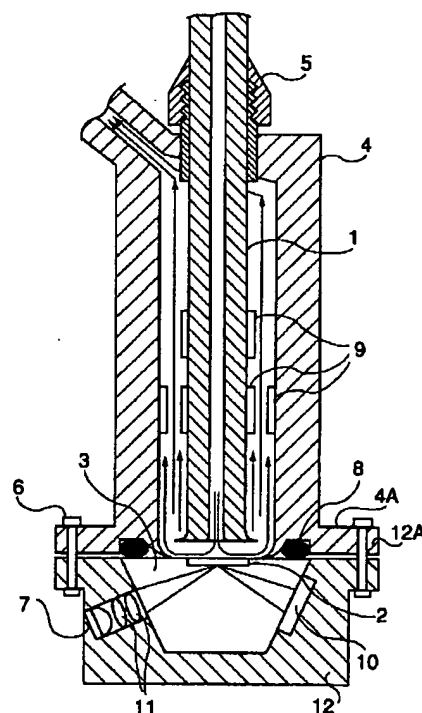
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 SPRセンサ装置および分析システムとこれを用いた検出方法

(57)【要約】

【課題】 小型で検出精度が高く複数物質の検出が可能な表面プラズモンセンサ装置を提供する。

【解決手段】 プリズム3の検出表面2に対して、流体の供給管1が直立して配置される。供給管1は直線的で、内部を流体が層流となって流れるよう十分に長い。供給管1の出口は検出表面2に対し僅かな隙間を開けて正対し、喇叭状に広がって流体の層流を乱さずに検出表面2に導きそして外方へ逃がす。流体の排出管4は大径の円管であって、その中心軸位置に供給管1が位置するように配置され、プリズム3の表面にボルト・ナット6で強固に圧着される。排出管4とプリズム3表面とのつなぎ目は、流体の流れを乱さないように滑らかに湾曲している。供給管1と排出管4には電気化学センサとしてのリング状電極9が取り付けられている。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 表面プラズモン励起光が照射される検出表面をもったSPRセンサ表面と、
前記検出表面に流体を供給するための管であって、前記流体が層流となって内部を流れるのに十分な長さを持ち、前記検出表面に対し近接して正対するよう配置された出口を有する供給管とを有するSPRセンサ装置。

【請求項2】 請求項1に記載のSPRセンサ装置において、前記供給管の内径が、前記検出表面に照射される前記表面プラズモン励起光のスポットの径よりも大きいSPRセンサ装置。

【請求項3】 請求項1に記載のSPRセンサ装置において、前記供給管の前記出口付近の内径が、前記出口に向かって喇叭状に滑らかに拡大しているSPRセンサ装置。

【請求項4】 請求項1に記載のSPRセンサ装置において、前記供給管の出口面が前記検出表面に対して平行であるSPRセンサ装置。

【請求項5】 請求項1に記載のSPRセンサ装置において、前記検出表面と前記供給管の出口との距離が可変であるSPRセンサ装置。

【請求項6】 請求項1に記載のSPRセンサ装置において、前記流体を排出するための管であって、前記供給管より大きい内径を持ち、前記供給管を包囲するようにして配置され、前記検出表面の周囲にて前記SPRセンサ表面と結合された入口面を有する排出管を更に備えたSPRセンサ装置。

【請求項7】 請求項6に記載のSPRセンサ装置において、前記排出管の入口付近の内径が、前記前記SPRセンサ表面に連続的につながるよう曲線的に狭まっているSPRセンサ装置。

【請求項8】 請求項6に記載のSPRセンサ装置において、前記供給管の外周面及び前記排出管の内周面の少なくとも一方に、電気化学センサのための電極が取り付けられているSPRセンサ装置。

【請求項9】 被検液をSPRセンサに導入している間における、前記SPRセンサが検出する表面プラズモン共振角の単位時間当たりの変化量から前記被検液に含まれる目的物質の濃度を求めるSPR検出方法。

【請求項10】 被検液に含まれる複数物質を分離するカラムと、
前記カラムからの溶出液が導入される吸光度計と、
前記カラムからの溶出液が導入される、目的物質に応答する信号を出力するSPRセンサ装置とを備えた分析システム。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は表面プラズモン共鳴（SPR）を利用したセンサ装置（本明細書では「SPRセンサ装置」という）、SPR検出方法及び分析シ

テムに関する。

【0002】

【従来の技術】 SPRセンサ装置は、その検出表面に接触した液体や気体の屈折率又は屈折率変化を検出できるもので、その原理を応用して例えば抗原抗体反応の測定などに利用される。その測定方法の例を示すと、被検体がバッファ液に溶質として存在する抗原で、センサの検出表面に抗体が固定化されている場合、まず抗原を含まないバッファ液をセンサセル（バッファ液や被検液などの流体を検出表面に接触させて流すための部屋）に流し、そのときの表面プラズモンの共振角を測定する。次に、被検体の抗原を含むバッファ液をセンサセルに流し抗原抗体反応を起こさせた後、抗原を含まないバッファ液でセンサセルを洗浄して再度表面プラズモンの共振角を測定する。こうして得られた抗原抗体反応の前後での表面プラズモン共振角の差が、抗体と反応した抗原の数に相当するので、これを溶質として存在した抗原の濃度に換算する。

【0003】 SPRセンサ装置は、検出表面上から約100nm以内に存在する被検体の屈折率変化を高感度に感知するため、検出表面上で流体が渦を巻くなど流れの乱れが生じた場合には正確な共振角が得られない。そこで、従来のSPRセンサ装置のセンサセルでは、検出表面上の流体の流れを完全な層流にするために、センサセルの流路径や流体の流速等のパラメーターから決まるある程度以上の長さをもった長い流路が検出表面と平行に配されている。

【0004】 ところで、液体クロマトグラフィ（以下、LCという）は、低～高分子の物質の電気的性質あるいは分子サイズの違いを利用して所望の物質を精製する手法であり、現在では主に生理活性物質の精製等に広く用いられている。その際、生体物質の追跡には260nmあるいは280nmの紫外光（以下、UVという）吸光度計が最も広く用いられており、所望の物質を含む種々の物質溶出位置はUV吸収のチャートで判別することができる。

【0005】 しかし、UV吸収チャート上のどのピークが所望の物質なのかを判断するためには、それぞれ所定の容量で分別された溶出液の生理活性をLC後に改めて測定する必要がある。ところが一般にこれらの生理活性の測定（バイオアッセイ）は複雑な、しかも熟練を要する操作を伴い、かつ長時間を要するものである。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 通常、SPRセンサ装置の検出表面はプリズム上に形成される。検出表面上で乱流を生じさせないようにするには、上述したようにセンサセルに適当な距離の直線流路を要するので、センサセルとプリズムが大型化し、SPRセンサ装置自体も大型化する。同時にプリズムは比較的高価な部品であるため、コストも高いものになる。これを回避するために流

体の流速を遅くすると測定に要す時間が長くなりセンサの実用性を損なってしまう。

【0007】また、従来のSPRセンサ装置は、溝状の細長い穴を有するゴム製パッキンとセンサ検出部であるプリズムとで、センサセルの流路を構成している。このため構造的に耐圧力性が乏しく低圧の流体測定にのみ使用されており、圧力を高くしなければならない用途、たとえば液体クロマトグラフィなどには使用できない。

【0008】センサセル内の流路では、様々な制約上、流路が直角もしくはそれに近い角度で曲がった部分を作らざるを得ない。この流路の曲がる部分では、流体のよどみを生じるため流体の交換性が悪く、さらに検出表面近傍で気泡が発生した場合、気泡が抜けにくく測定精度を悪化させる。

【0009】混合試料中に検出したい対象が複数あり、一つの対象が表面プラズモン共鳴法で検出可能で別の対象が電極型センサで検出可能である場合、それぞれのセンサを独立して用いて測定しなければならない。これは上述したように流体を層流でセンサセル中を流す必要と相俟って、センサ装置構成が大型化することを意味する。

【0010】従来のSPRセンサ装置の操作手順は、代表的な用途である抗原の測定を例にとると、次のようなものである。抗原と特異的に反応する抗体が検出表面に固定化される。最初に、抗原を含まないバッファ液の共振角を測定する。次に抗原を含むバッファ液で検出表面を一定時間満たして抗原抗体反応を生じさせる。反応後、抗原を含まないバッファ液で検出表面を洗浄し、反応後の共振角を測定する。そして、抗原抗体反応の前後での共振角の差を求め、それを抗原濃度に換算する。このように1回の測定には、反応前の測定、反応、反応後の測定という少なくとも3段階の手順が必要であり、このために測定に要する時間が長くなり、リアルタイムのレスポンスを期待されるセンサの魅力を損なっている。

【0011】また、LCに関しては、前述したように、LCにより分離精製された個々の物質の生理活性の測定に多大な労力と時間を要している。

【0012】従って、本発明の目的は、小型で測定精度の高いSPRセンサ装置を提供することにある。

【0013】本発明の別の目的は、小型で複数物質の同時検出が可能なSPRセンサ装置を提供することにある。

【0014】本発明のまた別の目的は、検出精度の高いSPR検出方法を提供することにある。

【0015】本発明のまた別の目的は、LCを用いた生理活性物質の分離精製及び生理活性物質の測定と、SPR装置による所望の生理活性物質のピークの同定とを実質的に同時に行える画期的な分析システムを提供することにある。

【0016】本発明の更に別の目的は、小型で、短時間

で測定結果が得られ、混合試料中の成分分離と特定の物質に対する特異性を有する成分の決定とを同時に行うSPRセンサ装置および分析システムを提供することにある。

【0017】

【課題を解決するための手段】本発明の第1の側面に従うSPRセンサ装置は、SPRセンサの検出表面に流体を供給するための供給管をセンサセル内に有している。この供給管は、その内部を流体が層流となって内部を流れるのに十分な長さを持ち、その流体出口は、検出表面に対し近接して正対するように配置されている。この構成によれば、被検液などの流体は供給管内で乱れのない層流となり、この層流のまま供給管から出て検出表面に接し、検出表面と供給管出口との間のわずかな隙間を通過して移動し排出される。流体が排出のために移動するときには流れが乱れることが予想されるが、SPRセンサは検出表面からわずか100nm程度の極近傍の被検体しか検出できないため、この乱流の影響は非常に小さい。また、供給管の出口が検出表面に正対させるためには、供給管は典型的には検出表面に対して直角に立った姿勢で配置されることになる。この配置により、SPRセンサのサイズを大型化することなしに、供給管の長さを十分に長くすることが可能である。因みに、流体の流れが層流となるような供給管の長さは、供給管の内径や流体の流速などのパラメータから決められる。

【0018】供給管の内径は、検出表面に照射される表面プラズモン励起光のスポットの径よりも大きいことが望ましい。表面プラズモンの励起光源には半導体レーザーやLEDが使われる。これらの光は通常1mm以下のスポット径に絞込み込むことは容易である。そして、供給管の内径を1mm以上にすることも容易である。供給管の内径が表面プラズモン励起光のスポット径よりも大きいことにより、表面プラズモンが励起される検出表面の全域を層流がカバーすることになる。

【0019】供給管の出口付近の内径は出口に向かって喇叭状に滑らかに拡大していることが望ましい。これによって検出表面に接した流体がスムーズに移動しやすくなり流れの乱れが低減される。また、供給管の出口面が検出表面に対して平行であることが望ましい。これによって検出表面に接した流体が移動するための検出表面と平行な流路が確保され、流れの乱れが低減される。

【0020】検出表面と供給管の出口との距離を調節するために機構を設けることができる。この距離がある値以上になると、流体は乱流となって検出表面に接することになる。層流のまま検出表面に届くための距離は流速によって異なる。流速に対応して距離を調整することによって、流体を層流のまま検出表面へ導くことが可能となる。

【0021】検出表面に接した流体を排出するための排出管は、供給管より大きい内径を持ち、供給管を包囲す

るようにして配置して、その排出管の入口面を検出表面の周囲にてSPRセンサ表面と結合するように取り付けることができる。このような排出管を用いることにより、排出管自体がセンサセルのケーシングとなっており、センサセルの構造がシンプルとなるので、SPRセンサ及びセンサセルを小型にまとめることが容易である。また、排出管の入口面をSPRセンサ表面と強固に密着させることにより、高耐圧のセンサセルを構成することも容易である。耐圧の観点から、排出管及び供給管は断面が円形の管であることが望ましい。

【0022】排出管の入口付近の内径はSPRセンサ表面に連続的につながるよう曲線的に狭まっていることが望ましい。これによって検出表面に接した後の被検体は流れが大きく乱されることなく排出管を通して排出される。

【0023】供給管の外周面及び排出管の内周面の一方又は双方に、電気化学センサのための電極を取り付けることができる。混合被検液中のある成分は表面プラズモンにより、またある成分は電気化学センサによって同一センサセル内で同時に測定される。

【0024】本発明の第2の側面に従うSPR検出方法は、被検液をSPRセンサに導入している間における、SPRセンサが検出する表面プラズモン共振角の単位時間当たりの変化量から被検液に含まれる目的物質の濃度を求めるものである。目的物質がSPRセンサの代表的アプリケーションである抗原である例では、まず抗原を含まないバッファ液が検出表面に流され、次に抗原を含む被検液が流される。この被検液が流されている間、共振角は時間とともに変化し、ある時間が経過した後はほぼ一定の値に落ち着く。この共振角が時間とともに変化するときの単位時間当たりの変化量は、抗原濃度と相関している。本発明の方法は、この単位時間当たりの共振角変化量から目的物質の濃度を決定する。単位時間当たりの共振角変化量は、後述するように分散が小さいので、この方法による測定精度は高い。

【0025】本発明の第3の側面に従う分析システムは、被検液に含まれる複数物質を分離するカラムと、カラムからの溶出液が導入される吸光度計と、カラムからの溶出液が導入される、目的物質に応答する信号を出力するSPRセンサ装置とを備える。例えば、複数種類のタンパクを含む混合被検液の例では、混合被検液はまずポンプでカラムに押し込まれ、カラム内で個々のタンパクに分離される。カラムの後には配管によって吸光度計がつながっている。分離されたタンパクは吸光度計によってカラムから各種類ごとに出てきたことを確認される。また、目的のタンパクと特異的に反応する抗体が固定化されたSPRセンサ装置が、吸光度計と並列に又は直列に配管によってつながっている。SPRセンサ装置から出力される共振角の信号は、分離された各種タンパクがSPRセンサ装置に入るたびに変化するが、タンバ

クが通り抜けるともとの基底値に戻る。しかし、SPRセンサ装置に固定化された抗体と特異的に反応するタンパクが来た場合、タンパクが通り抜けた後もその一部が抗体と結合しているため、共振角が基底値には戻らない。これによって、混合被検液中から目的のタンパクがいつSPRセンサ装置に入ったのか知ることができ、吸光度計の信号変化とカラムの特性から、目的のタンパクの特性などを知ることができる。

【0026】

10 【発明の実施の形態】図1は、本発明に係るSPRセンサ装置の一実施形態の要部の構成を示す。

【0027】プリズム3の上面に金薄膜を蒸着した検出表面2が形成されている。プリズム3の一傾斜面の外側には光源7が配置され、光源7とプリズム3間にはレンズ11が配置される。プリズム3のもう一方の傾斜面には、CCDラインセンサのような受光素子10が接合されている。これらプリズム3、光源7、レンズ11、受光素子10は、プリズムケース12内に収納され固定されている。

20 【0028】光源7は、検出表面2に向けて、その金薄膜に表面プラズモンを励起するための励起光線束を放射する。光源7から放射された励起光線束は、光学系によって検出表面2上に円錐状に集光される。検出表面2上に集光された励起光線束のスポットの直径は、光源7が例えばLEDの場合は0.5mm程度であり、また、光源7がレーザ発振器の場合は μm オーダーになる。励起光線束は検出表面2から反射され、その反射光線束が受光素子10に受光される。受光素子10は例えばCCDラインセンサであって、各画素の受光量を示す信号を出力する。受光素子10の出力信号レベルが極小となる画素位置がプラズモン共振角に対応する。

30 【0029】検出表面2に流体を流すためのセンサセルは、流体を検出表面2に供給するための供給管1と、検出表面2上を流れた流体を外部へ排出するための排出管4とを有する。

【0030】供給管1は円形断面をもつ真っ直ぐな長い管であり、検出表面2に対して直角に立った姿勢で配置されている。供給管1内には、ポンプ（図2参照）の力で流体が検出表面2へ向かって流される。供給管1は、その内部を流体が乱れの無い層流となって流れるように、供給管1の内径及び流体の流速等のパラメータから決定された十分な長さを有している。供給管1の内径（直径）は、光スポットの直径より大きく例えば1mmである。

【0031】供給管1の出口は、検出表面2の光スポットの当たる部分に正対している。この供給管1の出口は検出表面2に近接しており、この出口の検出表面2からの距離は管昇降機構5によって調整することができる。供給管1の出口付近の内径は、出口へ向かって喇叭状に曲線的に滑らかに拡大しており、出口において検出表面

2と平行面を形成して、この平行面がある程度の距離外方へ広がっている。

【0032】供給管1が十分に長いので流体は供給管1内で層流となり、層流のまま供給管1出口から出る。この層流が乱れずに検出表面2に届く距離は流体の流速によって異なる。そこで、管昇降機構5により供給管1出口と検出表面2間の距離を流速に応じて調整することにより、どのような流速でも、流体を層流のまま検出表面2に導くことができる。供給管1の内径が光スポットの径より大きいので、流体の層流は光スポットの全領域をカバーする。検出表面2に当たった流体は外方へ流れていくが、供給管1の出口付近の内径が喇叭状に滑らかに広がり、そして出口では検出表面2に対して平行面となって検出表面2に平行な流路を形成しているため、流体の層流は大きく乱れることなく検出表面2から外方へ流れていく。

【0033】排出管4は、供給管1より遙かに大きい内径をもち、断面が円形であり、供給管1を包囲するようにして、供給管1と同軸の位置関係をもって、プリズム3の表面に直角な姿勢で配置されている。排出管4の入口端部のフランジ4Aとプリズムケース12の端部のフランジ12Aとがボルト・ナット6で締め付けられていて、それにより、排出管4の入口面がプリズム3の表面に強固に圧着されている。排出管4端面とプリズム3表面間にはパッキン8が締め付け圧で潰された状態で介在して、両者のつなぎ目をシールしている。この構造により高耐圧のセンサセルが実現する。排出管4や供給管1の断面が円形であることも、高耐圧に寄与している。よって、高圧流体の測定が可能である。排出管4の入口部分の内径は、流体の層流を乱さぬよう、内側へ曲線的に狭まっていて、その入口の内周面はプリズム3表面と連続的に滑らかにつながっている。

【0034】供給管1の外周面と排出管4の内周面に、複数個のリング状電極9が設置されている。これらの電極9は電気化学センサとして機能することができる。例えば、この実施形態では3個のリング状電極9があり、その内の1個は表面が塩化銀であって参照極として動作し、他の2個は表面が白金であって作用極及び対極としてそれぞれ動作する。作用極の表面に例えば酵素であるグルコースオキシターゼを固定化することにより、この3つの電極9を用いた電気化学センサをグルコースセンサとして働かせることができる。一方、SPRセンサの検出表面2に例えば抗体を固定化することにより、このSPRセンサをタンパクセンサとして働かせることができる。このようにして、例えばグルコースとタンパクのような2種類の成分を同時に検出することが可能である。

【0035】図2は、図1に示したSPRセンサ装置に適用可能なポンプの一例の断面構造を示す。

【0036】このポンプはシリンジポンプであって、モ

ータ25によりシリンジ21内のピストン23を往復動させることにより、シリンジ21内の液溜室22に外部の流体を吸入したり、液溜室22内の流体を外部へ送出したりすることができる。シリンジ21は、液溜室22に連通した1本の中央流路27と、シリンジ外へ開口した異なる方向を向いた複数本、例えば6本、の外部流路（図3の平面図参照）29A～29Fとを有している。モータ33によりシリンジ21内の回転継ぎ手31を回転させてその方向を切り替えることにより、中央流路27を6本の外部流路29A～29Fのうちの一つに選択的に連通させることができる。

【0037】図4は、図1に示したSPRセンサ装置と図2に示したポンプとを組合せた検出システムの一例の全体構成を示す。

【0038】図2に示したポンプ41がもつ6つの外部流路のうちの5つ（29B～29F）に、バッファ液タンク43、被検液タンク45、解離液タンク47、廃液管49、及び図1に示したSPRセンサ装置51の供給管1が接続されている。ポンプ41のモータ25、33（図2参照）は、マイクロコンピュータ53による制御下で、モータドライバ55によって駆動される。ポンプ41を通じて、バッファ液、被検液、解離液を選択的にSPRセンサ装置51に選択的に供給することができる。SPRセンサ装置51の受光素子10からの出力信号57は、マイクロコンピュータ53に取り込まれ（又は、図示しない別のコンピュータに取り込まれ）自動処理される。

【0039】図5は、本発明のSPR検出方法の一実施形態を示すフローチャートである。図6は、この検出方法を実施している間のSPRセンサ装置におけるプラズモン共振角の変化を示している。この検出方法は、図2に示した検出システムを用いても、また従来の一般的な検出システムを用いても実施することができるが、図2のシステムを用いる場合には、図5に示す手順をマイクロコンピュータ53にプログラムすることにより自動的に行える。

【0040】まず、SPRセンサ装置にバッファ液を例えば2分間送る（ステップS1）。この間、プラズモン共振角は基底値に静定している。次に、被検液（例えばアルブミン溶液）のSPRセンサ装置への送りを開始する（S2、図6時刻t0）。すると、プラズモン共振角が変化し始める。被検液を送液し続けている間、時間の経過とともにプラズモン共振角は被検液内のアルブミン濃度に応じた固有の値に近づいていく。被検液の送液を開始してから第1の一定時間、例えば20秒、が経過した時点（図6時刻t1）でプラズモン共振角を測定する（S3）。続いて、被検液の送液開始から第2の一定時間、例えば40秒、が経過した時点で（図6時刻t2）再びプラズモン共振角を測定する（S3）。そして、20秒後と40秒後に測定した2つのプラズモン共振角の

差（つまり、この20秒間の共振角変化量）からアルブミン濃度を決定する（S5）。その後、被検液の送液を止め、次に解離液を例えば3分間流し（S6）、その後、バッファ液を4分間流す（S7）。これにより、プラズモン共振角は基底値に復帰する。

【0041】ところで、この本発明に従う検出方法は、被検液の送液中の共振角が変化している間の一定時間帯（例えば20秒後から40秒後まで）における共振角変化量、換言すれば、被検液送液中の平均的な単位時間当たり共振角変化量（共振角の時間微分つまり変化速度）から、被検液内の検出対象物の濃度を決定する方法であり、以下、この方法を「微分法」と呼ぶ。これに対し、従来の検出方法は、被検液の送液開始前の共振角（基底値）と、被検液を十分な時間送った後の共振角が完全に变化し終わった時点での共振角（エンドポイント）との差に基づいて、被検液中の対象物濃度を決定する方法であり、以下、この従来方法を「エンドポイント法」と呼ぶ。

【0042】図7と図8は、同じSPRセンサ装置と同じアルブミン標準液とを用いて、微分法及びエンドポイント法により実際にアルブミンの検量線をそれぞれ示す。なお、図中の縦軸の画素数における1画素は、共振角における1/100度に相当する。

【0043】これらの検量線を作成するため、5種類の濃度（1、3、10、30、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）のアルブミン標準液を用意した。1回の測定につきバッファ液2分間、被検液（アルブミン標準液）1分間、バッファ液2分間、解離液3分間及びバッファ液4分間の順に送液し、その間に2秒毎に共振角を計測した。各濃度につき5回ずつ測定を行った。

【0044】微分法に関しては、被検液の送液開始後20秒から40秒の20秒間の共振角変化量から、この20秒間における単位時間当たりの共振角変化量を算出した。そして、各濃度につき5回の単位時間当たりの共振角変化量を算出して、その標準偏差に基づくCV（変動係数）値を求め、更に横軸にアルブミン濃度（対数）、縦軸に変化量を取って図7に示す検量線を作成した。エンドポイント法については、各濃度につき5回の被検液送液前後の共振角の差を求め、その標準偏差に基づくCV値を求め、更に横軸にアルブミン濃度（対数）、縦軸に上記差を取って図8に示す検量線を作成した。図9は、こうして求めた微分法とエンドポイント法によるCV値を対比して示したものである。

【0045】図7、8から分かるように、微分法でもエンドポイント法でも十分に実用的な検量線を得ることができた。しかし、図9から分かるように、CV値は微分法の方がエンドポイント法より小さく、特に、低濃度のアルブミン溶液のCV値を比較すると、例えば、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アルブミン溶液ではエンドポイント法8.8%であったものが、本発明の微分法では4.28%と大幅に

改善された。従って、微分法の方がエンドポイント法より精度の高い検出が可能である。

【0046】図10～図13は、本発明にかかる65は、分析システムの幾つかの実施形態の構成を示す。

【0047】図10～図13において、符号60は分子ふるい作用を有する担体を充填したカラム（例えばTSKgel G3000Pw_{xl}）65を装着したHPLC装置（高圧LC装置）であり、被検液タンク61からポンプ63によって被検液が高圧でカラム65に送り込まれる。図10の実施形態では、カラム65の下流に吸光度計67が接続され、その下流にSPRセンサ検出表面上に目的物質と特異的反応をする物質を固定化した検出用のSPRセンサ装置71と、どのような物質とも反応をしない反応防止膜をセンサ検出表面上に設けた別のリファレンス用のSPRセンサ装置69とが並列に接続されている。図11の実施形態では、カラム65の下流に吸光度計67と検出用SPRセンサ装置71とリファレンス用SPRセンサ装置69とが並列に接続されている。図12の実施形態では、カラム65の下流に吸光度計67とリファレンス用SPRセンサ装置69と検出用SPRセンサ装置71とが順に直列に接続されている。図13の実施形態では、カラム65の下流にリファレンス用SPRセンサ装置69と吸光度計67と検出用SPRセンサ装置71とが順に直列に接続されている。なお、検出用SPRセンサ装置71を通ると被検液内の目的物質の濃度が低下するため、図10、12、13のように検出用SPRセンサ装置71と他の測定装置とを直列接続する場合には、検出用SPRセンサ装置71を最下流に配置するべきである。ここで用いるSPRセンサ装置69、71としては、高圧の送液に耐えられる例えば図1に示したようなものが好ましい。

【0048】図10～図13に示した分析システムでは、吸光度計67から出力されるUV吸収チャートのどのピークが所望の物質に対応するかの同定を、SPRセンサ装置69、71が検出した共振角の差の変化を用いて実時間で行うことができる。

【0049】以下に、図10の実施形態を用いて大腸菌 $\sigma 32$ 因子の分離と検出を実際に行った例を説明する。酵母エキス0.1%を加えたDavis最小培地で大腸菌K-12株を37℃、8時間培養した。その後、菌体を0.1 Mリン酸緩衝液（pH7.0）を用いて、遠心分離にて洗浄し、最終的に培養液の1/5容量の0.1 Mリン酸緩衝液（pH7.0）に懸濁させた（菌体濃度；約10の10乗/ ml ）。この懸濁液を5 mlずつ試験管に分注し、一方は37℃、もう一方は42℃の恒温水槽中で10分間保温し、保温後、氷冷し、直ちにフレンチプレスを用いて菌体を粉碎し、遠心分離後の上清（無細胞抽出液）を回収した。

【0050】続いて、カラム65としてTSKgel G3000PW_{xl}を装着したHPLC装置60を用い、流速1.0 ml

11

／minの0.2Mリン酸緩衝液を移動相として各無細胞抽出液を分離した。

【0051】カラム65の後段において、280nmの吸光度をモニターする吸光度計67を用いて、カラム64からの溶出液の吸光度をモニタリングした。更にその後段で、抗 σ 32因子マウスモノクローナル抗体をセンサ検出表面上に固定化した検出用SPRセンサ装置71と、抗体を固定化せず非特異吸着防止膜をセンサ検出表面に設けたリファレンス用SPRセンサ装置69のSPRセンサ出力の差分（以下、SPRレスポンスという）10

の変化をモニタリングした。
【0052】そのモニタリングの結果を、図14（37℃で保温した菌体の場合）と図15（42℃で保温した菌体の場合）に示す。図14、15において、点線は吸光度計の出力の時間経過に伴う変化を示し、実線はSPRレスポンスの時間経過に伴う変化を示している。図14から分かるように、37℃で保温した菌体の無細胞抽出液には抗 σ 32因子マウスモノクローナル抗体との結合に起因するレスポンスの変化はほとんど認められなかった。これに対し、図15に矢印で指し示すように、42℃で保温した菌体の無細胞抽出液には抗 σ 32因子マウスモノクローナル抗体との結合に起因するレスポンスの変化が明らかに認められた（すなわち、 σ 32因子がヒートショック蛋白であることが確認された）。このように、吸光度計67からのUV吸収のパターンとSPRレスポンスのパターンを重ねることで、大腸菌の無細胞抽出液より σ 32因子に相当する成分の分離と同定が同時に可能であった。

【0053】以上、本発明についての幾つかの実施形態を説明したが、本発明は上記実施例に限られるものではなく、その要旨を逸脱しない範囲において種々の変形や改良を加えた他の形態でも実施することが可能である。例えば、検出対象が他のタンパク、糖タンパク、核酸などであっても上述と同様の効果が得られるのは言うまでもない。また図15においてSPRセンサのレスポンスが変化した後、センサの検出部分に吸着した被検体を塩酸などを用いて分離再生してその後の測定を続けても良い。

【0054】

【発明の効果】本発明の1つの側面に従うSPRセンサ装置は、小型であっても、層流をセンサ検出表面上を流せるために測定精度が高い。

【0055】本発明の別の側面に従うSPRセンサ装置は、電気的センサを小型に内蔵しているため、小型であっても複数物質の同時検出が可能である。

【0056】本発明のSPR検出方法である微分法は検出精度が高い。

【0057】本発明の分析システムは、LCを用いた生理活性物質の分離精製及び生理活性物質の測定と、SP

12

R装置による所望の生理活性物質のピークの同定とを実質的に同時に行えるので、LCを用いた分析の効率が向上する。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明のSPRセンサ装置の一実施形態の要部の断面図。

【図2】 図1に示したSPRセンサ装置に適用可能なポンプの一例の断面図。

【図3】 図2のポンプの外部流路の配置を示す平面図。

【図4】 図1に示したSPRセンサ装置と図2に示したポンプとを組合せた検出システムの一例の全体構成図。

【図5】 本発明のSPR検出方法の一実施形態を示すフローチャート。2のポンプの外部流路の配置を示す平面図。

【図6】 図5の検出方法を実施している間のプラズモン共振角の変化を示す図。

【図7】 本発明の測定方法によるアルブミンの検量線を示す図。

【図8】 従来法によるアルブミンの検量線を示す図。

【図9】 微分法とエンドポイント法によるCV値を対比して示したものである。

【図10】 本発明の分析システムの第1の実施形態の構成図。

【図11】 本発明の分析システムの第2の実施形態の構成図。

【図12】 本発明の分析システムの第3の実施形態の構成図。

【図13】 本発明の分析システムの第4の実施形態の構成図。

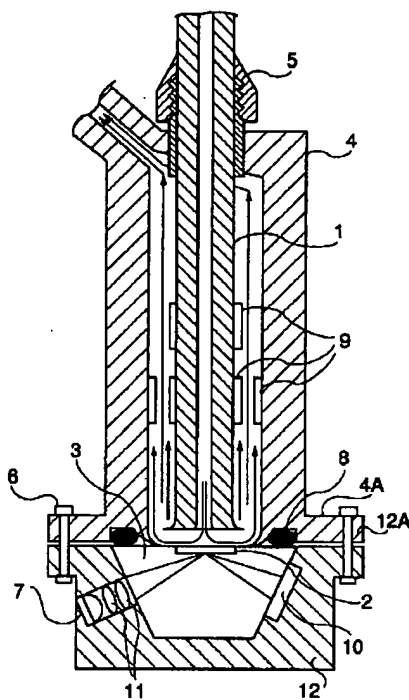
【図14】 37℃、10分熱処理した大腸菌無細胞抽出液の溶出液のUV吸収パターンと σ 32因子検出用のSPRレスポンスのパターンとを示した図。

【図15】 42℃、10分熱処理した大腸菌無細胞抽出液の溶出液のUV吸収パターンと σ 32因子検出用のSPRレスポンスのパターンとを示した図。

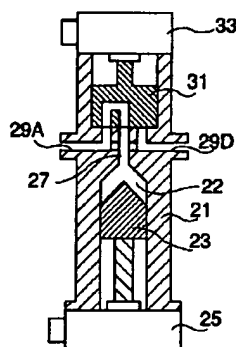
【符号の説明】

- 1 供給管
- 2 SPRセンサ検出表面
- 3 プリズム
- 4 排出管
- 5 管昇降機構
- 9 電極
- 41 ポンプ
- 51、69、71 SPRセンサ装置
- 60 HPLC装置
- 65 カラム
- 67 吸光度計

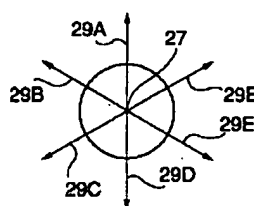
【図1】



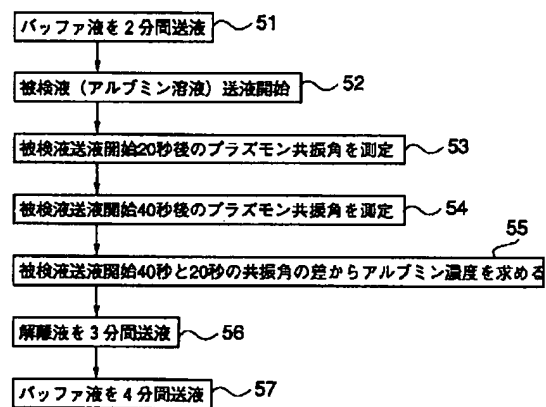
【図2】



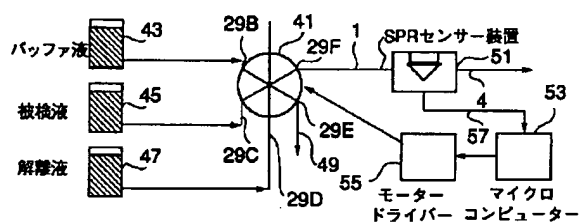
【図3】



【図5】

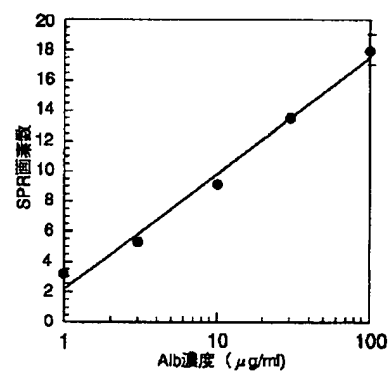


【図4】

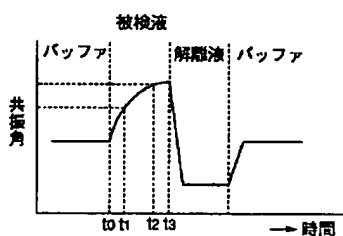


【図8】

エンドポイント法による検量線

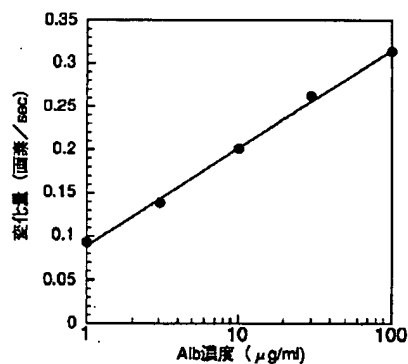


【図6】



【図7】

微分法による検量線

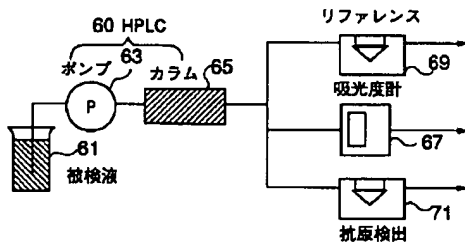


【図9】

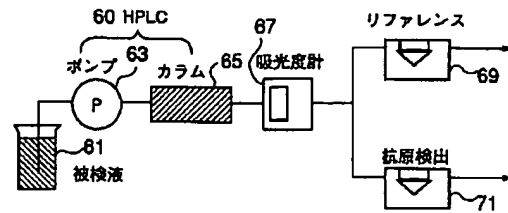
微分法とエンドポイント法のCV値比較

	100 $\mu\text{g/ml}$	30 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	3 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
微分法	1.64	0.77	1.88	1.14	4.28
エンドポイント法	0.51	0.78	3.35	0.64	8.81

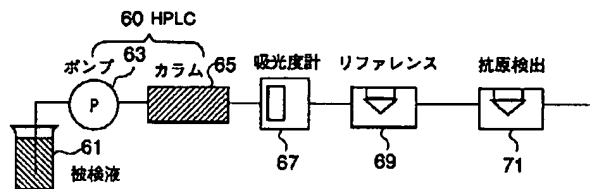
【図11】



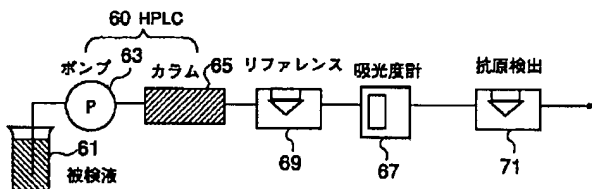
【図10】



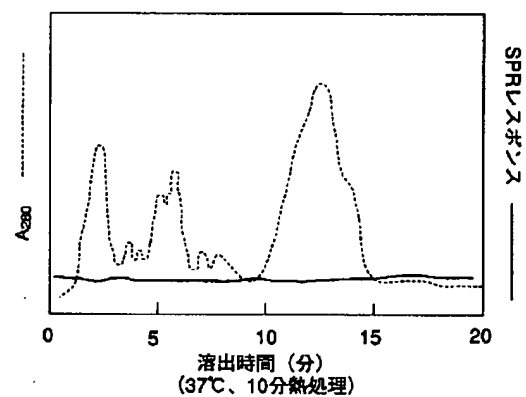
【図12】



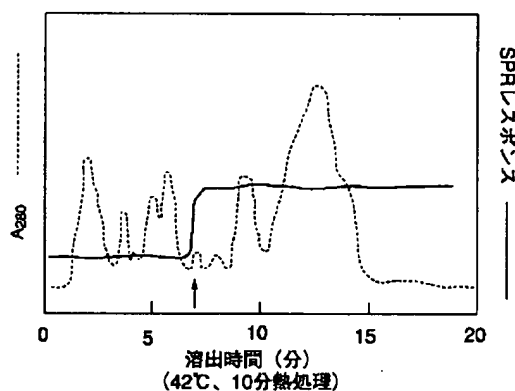
【図13】



【図14】



【図15】



フロントページの続き

(72)発明者 神崎 景介
福岡県北九州市小倉北区中島2丁目1番1
号 東陶機器株式会社内

(72)発明者 曾根崎 修司
福岡県北九州市小倉北区中島2丁目1番1
号 東陶機器株式会社内

(72)発明者 小川 恵美香
福岡県北九州市小倉北区中島2丁目1番1
号 東陶機器株式会社内